Aus dem Institut für Hygiene der Universität Düsseldorf
und dem Medizinischen Institut für Lufthygiene und
Silikoseforschung an der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. Hans-Werner Schlipköter

Abteilung für Experimentelle Pathologie
Leitung: Professor Dr. med. Werner Hilscher

ZELLKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG DER T_1 - PROSPERMATOGONIEN DURCH VINCRISTIN BEI DER RATTE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Joachim Maurer

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538106_0023

Aus dem Institut für Hygiene der Universität Düsseldorf
und dem Medizinischen Institut für Lufthygiene und
Silikoseforschung an der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. Hans-Werner Schlipköter

Abteilung für Experimentelle Pathologie
Leitung: Professor Dr. med. Werner Hilscher

ZELLKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG DER T_1 - PROSPERMATOGONIEN DURCH VINCRISTIN BEI DER RATTE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Joachim Maurer

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Meidzinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Straßburg

Referent
gez.: Prof. Dr. Hilscher

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Hofmann

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Material und Methodik	3
Resultate	7
Diskussion	10
Zusammenfassung	16
Schemata	18
Tabellen	24
Figur	27
Abbildungen	28
Literatur	30
Lebenslauf	35

I. Einleitung

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Wirkung von Vincristin auf die T_1-Prospermatogonien der Ratte zu testen. Die T_1-Prospermatogonien (primary transitional prospermatogonia) entstehen bei der Ratte während der "Präspermatogenese" um den 17. Fetaltag durch Zellteilung der letzten Generation der M-Prospermatogonien (multiplying prospermatogonia). Sie stellen die "ameiotische" Parallelpopulation der frühen Oocyten dar, die bei der Ratte gleichfalls um den 17. Fetaltag durch Teilung der letzten Oogoniengeneration entstehen (Schema 1).

Nach einer langen G_1-Phase von ca. 10 Tagen durchlaufen die T_1-Prospermatogonien vom 4. Tag p.n. (postnatum) an die 11,5 Stunden lange S-Phase und anschließend die kurze G_2-Phase. Um den 5. Tag p.n. entstehen durch Mitose der T_1-Prospermatogonien die T_2-Prospermatogonien (secondary transitional prospermatogonia). Diese Zellkategorie repräsentiert das zweite Stadium männlicher Geschlechtszellen im Übergang von M-Prospermatogonien zu A-Spermatogonien.

Mit dem Erscheinen der ersten A-Spermatogonien, den Tochterzellen der T_2-Prospermatogonien, beginnt am 6. Tag die Spermatogenese.

Vincristin ist eines der extrahierten Hauptalkaloide aus der Immergrünart Vinca rosea Linn.. Seine Haupt-

wirkung beruht auf dem stathmokinetischen Effekt, d.h., es verursacht eine Störung des Zellteilungsablaufes durch Blockierung der Metaphase (Frei et al., 1964). Der genaue Wirkungsmechanismus ist noch nicht geklärt. Die mitoseblockierende Wirkung wurde herangezogen, um zu versuchen, eine Synchronisation von Zellpopulationen durchzuführen (Klein et al., 1972, 1974; Hartenstein et al., 1973; Jellinghaus et al., 1975), wonach jedoch divergierende Ergebnisse vorliegen.

Im Vordergrund dieser Untersuchungen standen bei der Ratte bisher Knochenmarks- und Haarwurzelzellen (Frei et al., 1964), Gewebe eines künstlich erzeugten Mamma-Tumors sowie das Intestinal-Epithel des Jejunums (Tannock, 1965).

Für den Einsatz von Vincristin an Geschlechtszellen liegen bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch keine Hinweise vor.

II. Material und Methodik

1. Tiermaterial

Die Untersuchungen erfolgten an fünf Tage alten, männlichen Jungratten eines vom Zentralinstitut für Versuchstiere, Lettow-Vorbeck-Allee, Hannover gelieferten Randomstammes (Wistar W.U.). Zur Gewinnung der Jungtiere kamen zwei adulte, männliche Ratten um 17 Uhr für eine Nacht zu vier bis sechs gleichaltrigen, weiblichen Tieren. Am darauffolgenden Tag zwischen 8 und 9.30 Uhr erfolgte die Trennung von Männchen und Weibchen sowie die anschließende Gewichtsbestimmung der weiblichen Tiere. Dieser Tag wurde als Beginn einer möglichen Trächtigkeit angenommen und erster Trächtigkeitstag = 1. Tag p.c. (post conceptionem) genannt. Um die Trächtigkeit mit einiger Sicherheit festzustellen, wurden die Tiere am 6. und 16. Tag erneut gewogen und die Gewichte in einem Formular neben dem Ausgangsgewicht eingetragen. Bei einer Gewichtszunahme von mehr als 90 Gramm innerhalb der ersten 16 Tage p.c. wurde eine Trächtigkeit als annähernd sicher angenommen. Ab dem Tage 16 p.c. stützte den Nachweis einer Trächtigkeit die zusätzliche Palpation der Tiere durch die Bauchdecke. Auf den Nachweis der Trächtigkeit durch das Vorkommen von Vaginalpfröpfen bzw. das Auswerten von Scheidenabstrichen von Sperma wurde verzichtet, weil

sich diese Methode in der Vergangenheit als recht unsicher erwiesen hatte. Die als trächtig angesehenen Tiere kamen in Einzelkäfige. Um den Geburtstermin möglichst genau bestimmen zu können, wurden die Tiere vom 20. Tag p.c. in Abständen von 8 Stunden beobachtet. Diese Vorsorge wurde getroffen, da die Erfahrung gezeigt hatte, daß der Geburtstermin (= 23. Trächtigkeitstag) der Tiere bei diesem Randomstamm relativ großen Schwankungen unterliegt.

In 9 aufeinanderfolgenden Ansätzen wurden insgesamt 44 männliche Jungratten von 17 Muttertieren gewonnen. Die Versuchsserie A setzte sich aus 15 Jungtieren zusammen, die am 23. Trächtigkeitstag und die Versuchsserie B aus 29 Tieren, die am 22. Trächtigkeitstag geworfen worden waren.

2. Versuchsdurchführung

Zur "Blockierung" wurde das Alkaloid aus der Immergrünart Vinca rosea Linn., "Vincristin, Lilly" (VCR), der Firma Lilly GmbH Giessen verwandt.

Vier Stunden vor der Tötung erfolgte die intraperitoneale Injektion mit Vincristin. Die Tiere wurden in tiefer Äthernarkose durch Decapitation getötet.

Der Zeitpunkt der Tötung lag bei den Tieren der Versuchsserie A exakt bei fünf Tagen = 120 Stunden p.n. (post natum). Die Tiere der Versuchsserie B wurden in vier Untergruppen mit unterschiedlichen Tötungstermi-

nen zusammengefaßt, um die um einen Tag kürzere Präspermatogenese gegenüber den Tieren der Versuchsserie B auszugleichen:

B (1) 3 Jungtiere am 5. Tag p.n. = 120 h

B (2) 5 Jungtiere am $5^1/2$ Tag p.n. = 132 h

B (3) 2 Jungtiere am $5^3/4$ Tag p.n. = 138 h

B (4) 19 Jungtiere am 6. Tag p.n. = 144 h

Die Versuchsserie A wurde quantitativ, die Versuchsserie B semiquantitativ ausgewertet.

Für den Einsatz von VCR bei Untersuchungen an Gonaden der Ratte liegen bisher keine Dosisangaben vor.

In einem Vorversuch bei den Tieren aus der Versuchsserie A, sowie den Gruppen B (1) und B (4) wurde in Anlehung an die Untersuchungen von Tannock (1965) am Jejunum und am BICR / MI-Tumor der Ratte die Dosis 0,500 mg/kg Ratte gewählt. Die weiteren Versuche wurden dann mit der halben Dosis von 0,250 mg/kg Ratte durchgeführt.

3. Bearbeitung des Materials

Die Gonaden wurden unmittelbar nach der Tötung exstirpiert und sofort in Bouin'scher Lösung fixiert, in Paraplast eingebettet und 4 µm dick geschnitten. Die Färbung der Schnitte erfolgte mit Hämalaun - Eosin.

4. Auswertung des Materials

Um Mehrfachzählungen von Mitosen und Interphasenkernen zu vermeiden, wurde nur jeder 3. Schnitt ausgewertet.

Zur Auswertung kamen nur annähernd rund angeschnittene Keimstränge der beiden äußeren, der Tunica albuginea am nächsten liegenden Keimstrangreihen, um von einer weitgehend gleichmäßigen Verteilung des VCR im Gewebe ausgehen zu können.

Zunächst erfolgte die Bestimmung der Mitoseindices (Mitosen pro 1000 Geschlechtszellen) bei den einzelnen Tieren. Dann wurde die Untergliederung der Interphasenkerne in T_1-Prospermatogonien und T_2-Prospermatogonien vorgenommen. Außerdem wurden die Mitosen der T_1-Prospermatogonien in intakte und degenerierte Mitosen unterteilt.

III. Resultate

Die Auswertungsergebnisse von Versuchsserie A sind in der Tabelle 1 und 2 niedergelegt und in Fig. 1 grafisch dargestellt.

In Tab. 3 sind die bei der semiquantitativen Auswertung der Versuchsserie B ermittelten Ergebnisse zusammengefaßt.

Zu Tab. 1:

In Spalte 1 ist die Gruppe bzw. der entsprechende Wurf von Jungtieren eingetragen. Spalte 2 enthält die Anzahl der T_1-Prospermatogonien (T_1-PSG) pro 1000 Geschlechtszellen. In den Spalten 3 bis 5 ist die Anzahl der ausgewerteten Mitosen der T_1-Prospermatogonien (Abb. 1) angegeben, wobei die Spalten 3 (T_1-M) die intakten, 4 (T_1-$M_{deg.}$) die degenerierten und 5 (T_1-$M_{ges.}$) die intakten plus degenerierten Mitosen wiedergeben. Spalte 6 gibt die Anzahl der T_2-Prospermatogonien (T_2-PSG) pro 1000 Geschlechtszellen an.

Zu Tab. 2:

In Spalte 1 sind die Mitoseindices für die Kontrolltiere und in Spalte 2 die der VCR-behandelten Tiere eingetragen (Abb. 1, 2), ferner die entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die Resultate aus Tab. 1 und 2 sind in Fig. 1 grafisch dargestellt. Es handelt sich dabei um 5 Säulen-

paare, die nach den entsprechenden Mittelwerten gestaltet wurden, und von denen jeweils die linke, optisch leere Säule die Daten der Kontrolltiere und die rechte schraffierte Säule die Werte der mit VCR injizierten Tiere wiedergeben.
Das Säulenpaar I gibt die Werte für die Anzahl der T_1-Prospermatogonien (T_1-PSG) wieder,
das Säulenpaar II die Daten für die intakten Mitoseindices der T_1-Prospermatogonien (T_1-M)
das Säulenpaar III die Daten für die degenerierten Mitosen der T_1-Prospermatogonien (T_1-$M_{deg.}$)
das Säulenpaar IV die Werte für die Gesamtzahl aller in der Mitose befindlichen T_1-Prospermatogonien (T_1-$M_{ges.}$)
und das Säulenpaar V die Daten für die Zahl der T_2-Prospermatogonien (T_2-PSG).
Die entsprechende Standardabweichung ist an jedem Säulenende ober- und unterhalb des zugehörigen Mittelwertes markiert.
Tab. 3 betrifft die Auswertungsergebnisse von Versuchsserie B. Sie wurden durch semiquantitative Auswertung ermittelt, da

1.) die anfangs gewählte höhere VCR-Dosis eine überdurchschnittlich hohe Degeneration sowohl von Keimzellen (Abb. 1, 2, 3) als auch

von Stützzellen (Abb. 1, 2, 3) bewirkte und

2.) die Präspermatogenese der zu früh geworfenen Tiere durch einen entsprechend herausgezögerten Tötungstermin nicht ausgeglichen werden konnte.

Spalte 1 gibt die Gruppe bzw. den entsprechenden Wurf an, Spalte 2 die Trächtigkeitsdauer der betreffenden Muttertiere. In Spalte 3 ist der Tötungstermin in Tagen postnatal dokumentiert und in Spalte 4 die dann eingesetzte Vincristin-Dosis in mg/kg Ratte, wobei der Wert 0 sich immer auf die Kontrolle bezieht. In Spalte 5 sind die intakten, in Spalte 6 die degenerierten T_1-Prospermatogonien (T_1-PSG bzw. T_1-$_{deg.}$) eingetragen. Spalte 7 gibt die intakten und Spalte 8 die degenerierten Mitosen der T_1-Prospermatogonien (T_1-M bzw. T_1-$M_{deg.}$) an. In Spalte 9 sind die intakten und in Spalte 10 die zugrunde gegangenen T_2-Prospermatogonien (T_2-PSG bzw. T_2-$_{deg.}$) aufgeführt. Spalte 11 enthält die intakten (Abb. 1, 2) und Spalte 12 die degenerierten Mitosen der T_2-Prospermatogonien (T_2-M bzw. T_2-$M_{deg.}$), (Abb. 3).
Die Spalten 13 und 14 geben den Nebenbefund der VCR-Wirkung auf die Stützzellen-Mitosen wieder, wobei Spalte 13 die intakten und Spalte 14 die degenerierten Mitosen (Abb. 1, 2) angeben.

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Beeinflussung der T_1-Prospermatogonien durch Vincristin durchgeführt. Vincristin dient in der Medizin als Chemotherapeutikum, vorwiegend bei der Behandlung von Akuten Leukämien und malignen Lymphomen. Von Klein, Hartenstein und Jellinghaus (Klein et al., 1972, 1974; Hartenstein et al., 1973; Jellinghaus et al., 1975) wurde Vincristin zur Synchronisation von Tumorzellen mit unterschiedlichen Ergebnissen eingesetzt.

Die T_1-Prospermatogonien wurden aus zweierlei Erwägung als Untersuchungsobjekt gewählt.
Zum einen stellen sie eine im Entwicklungsablauf der männlichen Gametogenese sehr gut zeitlich definierte Zellpopulation dar. Sie entstehen bei der Ratte um den 17. bis 18. Fetaltag und durchlaufen nach einer etwa 10 Tage langen G_1-Phase um den Tag 5 p.n. die S-Phase, G_2-Phase und M-Phase.
Zum anderen schien es anhand der Literaturangaben durchaus im Rahmen des Möglichen zu liegen, durch Synchronisation der T_1-Prospermatogonien den Aufbau des Samenepithels zu beeinflussen.

Wie von zahlreichen Autoren ausgeführt worden ist, (v. Ebner, 1871, 1888, Regaud, 1901, 1906, Roosen-Runge und Giesel, 1950, Leblond und Clermont, 1952 a,b, Oakberg, 1955 a,b, und 1956 a,b, Monesi, 1962 a,b, Hilscher und Maurer, 1962, Courot et al., 1970), zeigt das Samenepithel der Mammalia mit Ausnahme der Menschen-

affen und des Menschen (Leidl und Waschke, 1970) einen eigenartigen Aufbau: Innerhalb eines Kanälchenquerschnittes befinden sich mehrere aufeinanderfolgende "synchronisierte" Keimzellschichten unterschiedlichen Reifegrades. Wie Hilscher (1974) ausführt, zeigt das Samenepithel neben dieser horizontalen Anordnung der aufeinanderfolgenden Zellschichten eine vertikale, von der Basalmembran zur Kanälchenlichtung orientierte Gliederung in Form von Zellassoziationen. Eine Zellassoziation ist ein Gewebsverband, der dadurch gekennzeichnet ist, daß die Entwicklungsphasen, in denen sich die Geschlechtszellen befinden, genau aufeinander abgestimmt sind (Schema 2). Da das Samenepithel von vier bzw. fünf aufeinanderfolgenden Schichten gebildet wird, setzt sich auch eine Zellassoziation aus vier bzw. fünf Schichten von Geschlechtszellen zusammen. Diese befinden sich jeweils in einer ganz bestimmten Entwicklungsphase und sind in der Vertikalen so miteinander assoziiert, daß sie stets nur in dieser einen Kombination vorkommen, d.h. sie bilden ein in den Samenkanälchen immer wieder auftretendes, stets gleichbleibendes Phasenmuster der Geschlechtszellen. Bei der Ratte haben Leblond und Clermont (1952 a, b) anhand der vorliegenden verschiedenen Zellassoziationen die Spermatogenese in 14 Stadien unterteilt, die z.T. ihrerseits in Unterstadien gegliedert werden.

Wie von Ebner (1888), Regaud (1901), Regaud und Blanc (1906), Leblond und Clermont (1952 a, b), Hilscher und Maurer (1962), Courot et al., (1970) sowie Leidl und Waschke (1970) zeigen konnten, sind ferner bei den meisten Mammalia die einzelnen aufeinanderfolgenden Stadien im Verlauf eines Kanälchenabschnittes bzw. in dessen Längsrichtung hintereinandergeschaltet und bilden so eine "Welle" (Schema 3).

Das Samenepithel des Menschen und - wie Leidl und Waschke (1970) hervorgehoben haben - auch das Samenepithel der Menschenaffen sind nicht so übersichtlich gegliedert wie das der Ratte und anderer Säugetiere (Schema 4). Die verschiedenen Stadien sind nicht in Form einer "Welle" angeordnet.

Mit den anderen Mammalia haben Mensch und Menschenaffe aber immerhin gemeinsam, daß die Zellen einer Schicht eines Gewebsverbandes - mag dieser nun dem Namen "Assoziation" gerecht werden oder nicht - synchronisiert sind. Diese "Synchronisation" wird auf "interzelluläre Brücken" zwischen Geschlechtszellen einer Schicht zurückgeführt (Dym und Fawcett, 1971)

und als Indiz für die Abstammung der synchronisierten Geschlechtszellen der betreffenden Schichten von einer gemeinsamen Ausgangszelle gewertet.
Der Gedanke lag nahe, zu versuchen, die T_1-Prospermatogonien mit Hilfe von Vincristin zu synchronisieren. Falls eine solche Synchronisation möglich sein sollte, so war zu vermuten, daß der "wellenförmige" Aufbau der Samenkanälchen in den Testes der mit Vincristin vorbehandelten Tiere eventuell gestört oder sogar verloren gehen würde. Im optimalen Fall war - rein hypothetisch - ein Samenepithel denkbar, dessen Aufbau einem einzigen Stadium entsprach: abhängig vom jeweiligen Zeitpunkt der Tötung würde man in den verschiedenen Querschnitten der Samenkanälchen z.B. nur das Stadium I oder das Stadium VII oder das Stadium XII vorfinden.

Die vorliegenden Untersuchungen haben ergeben, daß der Zeitpunkt des Eintritts der T_1-Prospermatogonien in die Mitose vom Geburtstermin abhängt: bei dem untersuchten Rattenstamm verhielten sich nur T_1-Prospermatogonien von Jungtieren normgerecht - d.h. Eintritt in die Mitose um den 5. Lebenstag (Allhoff et al., 1975) - die am 23. Trächtigkeitstag geworfen worden waren. In den Gonaden von Tieren, die am 22. Trächtigkeitstag geworfen worden waren, war der Eintritt in die Mitose größeren Schwankungen unterworfen. Vergleichende quantitative Auswertungen wurden daher nur an Gonaden der am 23. Trächtigkeitstag geworfenen Ratten durchgeführt.
Wie aus den in Tab. 1 dokumentierten Werten hervorgeht, liegt die Anzahl intakter Mitosen nach vorausgegangener Vincristingabe im Schnitt drei- bis viermal so hoch wie in den Testes der Kontrolltiere. Die

Anzahl degenerierter T_1-Mitosen ist bei den mit Vincristin vorbehandelten Tieren etwa zweimal so hoch. Hinsichtlich der Anzahl der T_2-Prospermatogonien, die durch Zellteilung aus den T_1-Prospermatogonien hervorgehen, stimmen Kontrollgruppe und Versuchsgruppe überein.

Ein Synchronisationseffekt von Vincristin konnte daher bei den Geschlechtszellen der am 23. Trächtigkeitstag geworfenen Ratten nicht nachgewiesen werden. Diese Befunde stehen im Einklang mit Angaben von Maurer - Schultze (1981), die durch Vincristin keine Synchronisation von Tumorzellen erzeugen konnte.

Da, wie bereits ausgeführt, der Eintritt der T_1-Prospermatogonien in die Mitose bei den am 22. Trächtigkeitstag geworfenen Tieren großen Schwankungen unterworfen war, wurden die Testispräparate dieser Tiere nur semiquantitativ ausgewertet. Wie aus Tab. 3 entnommen werden kann, weisen diejenigen Tiere, die am Tag 5 p.n. getötet worden waren, sowohl in den Testes der mit Vincristin vorbehandelten Tiere als auch in den Testes der Kontrolltiere einen hohen Prozentsatz intakter T_1-Prospermatogonien in Interphase auf, aber keine Mitosen. Daher wurde versucht, die intrauterin um einen Trächtigkeitstag verkürzte Präspermatogenese extrauterin einen Tag auszugleichen, indem die Tötung der Ratten erst am Tag 6 p.n. erfolgte. Wie die Auswertung ergab, sind zwar in den

Testes der mit Vincristin vorbehandelten und den Testes der Kontrolltiere eine große Anzahl intakter sowie degenerierter T_2-Prospermatogonien enthalten, jedoch wiederum nur vereinzelte T_1-Mitosen. In der Annahme, daß die T_1-Mitosen bei den am Tag 22 p.c. geworfenen Tieren zwischen dem Tag 5 und 6 p.n. abläuft, wurden in einem weiteren Versuch die Tiere an den Tagen 5,5 und 5,75 p.n. getötet. Die Auswertung der Testes dieser Tiere ergab gleichfalls keinen Anstieg der Mitoserate. Ein weiterer Befund, der in Tab. 3 dokumentiert wird, gibt die Zwischenergebnisse auf der Suche nach der geeigneten VCR-Dosis wieder. In Anlehnung an die Arbeit von Tannock (1965) am Jejunum und am BICR/MI-Tumor der Ratte wurde auch in der vorliegenden Untersuchung zunächst die Dosis von 0,500 mg/kg Ratte gewählt. Bei dieser Dosierung zeigte sich, daß bei den zeitgerecht geworfenen Tieren eine erhebliche Degeneration der T_1-Mitosen bei nur wenig intakten T_1-Mitosen auftrat. Im Gegensatz dazu weisen die um einen Tag zu früh geworfenen und am Tag 5 p.n. getöteten Jungratten weder intakte noch degenerierte T_1-Mitosen auf. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich mit der 10 Tage langen, von dem Geburtstermin unabhängigen Generationszeit der T_1-Prospermatogonien zu begründen. Hieran schließt sich zeitlich auch die Aussage in Tab. 3 an, daß die Testes der am 22. Trächtigkeitstag

geworfenen, aber erst am Tag 6 p.n. getöteten Tiere eine große Anzahl intakter und degenerierter T_2-Prospermatogonien sowie deren Mitosen enthalten. Außerdem wurde beobachtet - wie es auch der Tab. 3 zu entnehmen ist -, daß die Stützzellmitosen ähnlich empfindlich auf diese Dosis reagierten. Dies alles berücksichtigend wurde der Versuch unternommen, mit der halben Dosierung, also mit 0,250 mg/kg Ratte, zu verwertbaren Ergebnissen zu kommen. Hinsichtlich der Toxicität des Vincristins wurden mit dieser Dosierung dann wesentlich bessere Erfolge erzielt, worauf auch alle eingangs zur Diskussion herangezogenen Resultate beruhen.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung des Cytostatikums Vincristin auf die T_1-Prospermatogonien untersucht werden.

Es kam dabei vor allem darauf an, einen in der Literatur (Klein et al., 1972, 1974; Hartenstein et al., 1973; Jellinghaus et al., 1975) umstrittenen Synchronisationseffekt nachzuweisen oder auszuschließen.

Ausgewertet wurden die Gonaden von selbstgezogenen, männlichen Jungratten eines vom Zentralinstitut für Versuchstiere in Hannover gelieferten Randomstammes (Wistar W. U.). Die Vincristin-Applikation und die vier Stunden darauf stattfindende Tötung und Fixierung erfolgte bei fünf Tage alten Jungratten (Tag 5 p.n.), die am Tag 23 p.c. geworfen worden waren. Zu diesem Zeitpunkt durchlaufen die T_1-Prospermatogonien die S-Phase und die Mitose (Allhoff et al., 1975; Hilscher und Hilscher, 1976).

Die zunächst in Anlehnung an Tannock (1965) gewählte Dosis von 0,500 mg/kg Ratte war zu hoch. Sie verursachte den Zelltod eines großen Teils der Interphasen und Mitosen der T_1-Prospermatogonien. Nach erfolgter Halbierung der Dosis auf 0,250 mg/kg

Ratte konnten drei- bis viermal höhere Mitoseindices gegenüber den Kontrolltieren beobachtet werden (Tab. 1 und 2, Fig. 1).

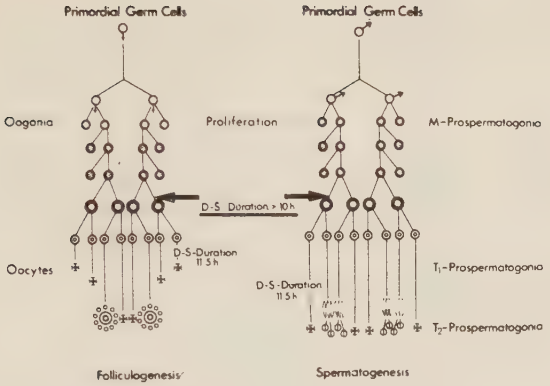
Bei den Jungratten, die am Tag 22 p.c. geworfen worden waren, kann keine einheitliche Aussage über die Vincristin-Wirkung gemacht werden. Am Tag 5 p.n. ließ sich kein Effekt von Vincristin auf die T_1-Prospermatogonien erkennen. Bei jedem später getesteten Zeitpunkt war die Mitose offensichtlich bereits durchlaufen worden: es fanden sich dann nur noch intakte und degenerierte Interphasen und Mitosen von T_2-Prospermatogonien (Tab. 3, Abb. 1-3).

Der Hauptversuch wurde daher nur an Geschlechtszellen von Tieren durchgeführt, die am Tag 23 p.c. geworfen worden waren. Eine Synchronisation der Geschlechtszellen ließ sich nicht erzielen. Dieser Befund steht im Einklang mit Untersuchungsergebnissen von Maurer - Schultze (1981) an Tumorzellen.

Schemata

Schema 1

Diagramm der weiblichen und männlichen Gametogenese. Die Zelltypen im "Gonien-Stadium" sind mit Sternchen gekennzeichnet. Aus Hilscher und Hilscher (1976).


Primordial Germ Cells
Primordial Germ Cells
Oogonia
Proliferation
M-Prospermatogonia
D-S Duration > 10 h
D-S-Duration 11.5 h
Oocytes
D-S-Duration 11.5 h
T1-Prospermatogonia
T2-Prospermatogonia
Folliculogenesis
Spermatogenesis

Schema 1

Schema 2

Modifiziertes Schema der Spermatogenese nach Perey, Clermont und Leblond.

Unterste erste Reihe: Undifferenzierte Spermatogonien und A_1-Spermatogonien bis Stadium IX. A_2-Spermatogonien bis Stadium XII, A_3-Spermatogonien bis Stadium XIV.

Zweite Reihe: A_4-Spermatogonien in Stadium I, Im-Spermatogonie bis Stadium IV, B-Spermatogonien bis Stadium VI. Präleptotäne I-Spermatocyten bis Stadium VIII, leptotäne I-Spermatocyten bis Stadium XI, zygotäne I-Spermatocyten bis Stadium XIV.

Dritte Reihe: Pachytäne I-Spermatocyten bis Stadium XII, diplotäne I-Spermatocyten in Stadium XIII, II-Spermatocyten in Stadium XIV.

Vierte und fünfte Reihe: Spermatiden bis Stadium VIII.

Die Punkte rechts über den Spermatogonien geben an, daß in diesen Stadien (IX, XII, XIV, I, IV, VI) die Mitosen der Spermatogonien (A_1-B) stattfinden. Die Reifeteilungen, die im Stadium XIV a und e stattfinden, sind nicht berücksichtigt. Aus Hilscher (1974).

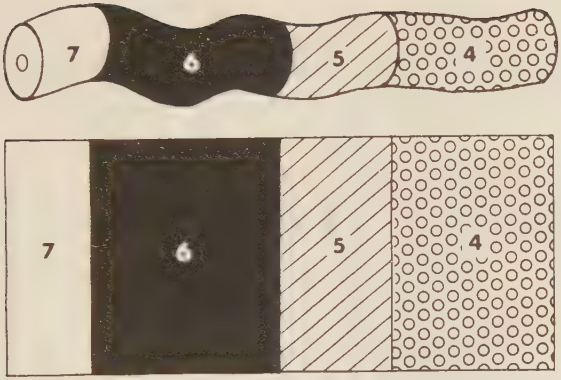
Schema 2

Schema 3

Oben: Abschnitt eines Samenkanälchens des Rindes mit den Stadien 4, 5, 6 und 7.
Unten: Könnte man das Samenkanälchen an der Seite aufschneiden und aufrollen, so erhielte man aneinandergereihte Streifen, die den einzelnen Stadien entsprechen.
Übernommen von Leidl aus Hilscher (1974).

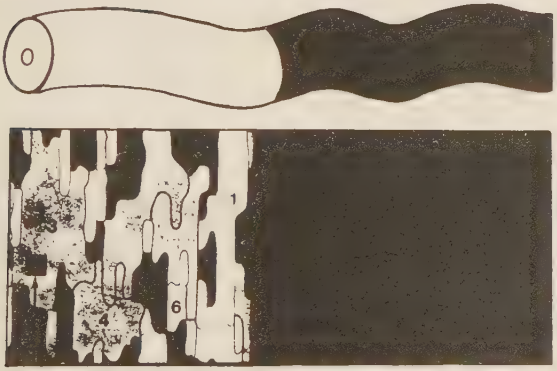
Schema 4

Oben: Abschnitt eines Samenkanälchen des Menschen.
Unten: Könnte man das Samenkanälchen an der Seite aufschneiden und aufrollen, so erhielte man Streifen, die aus verschiedenen Flecken - ohne jede ersichtliche Ordnung - zusammengesetzt sind.
Übernommen von Leidl aus Hilscher (1974).



Schema 3

Mensch



Schema 4

Tabelle 1
Versuchsserie A
Gesamtauswertung

Gruppe	T_1 - PSG	T_1 - M	T_1 - M deg.	T_1 - M ges.	T_2 - PSG	
H 78 1 A 14	975	4	2	6	19	Kontrolle
H 78 1 A 6	786	26	7	33	181	
H 78 1 H 3	647	23	9	32	321	
H 78 1 C 2	656	28	4	32	312	
$\bar{x}$	766	20,25	5,5	25,75	208,25	
s	132,6	9,55	2,69	11,40	141	
H 78 1 A 2	699	96	11	107	194	VCR
H 78 1 A 8	707	77	8	85	208	
H 78 1 C 3	671	101	12	113	216	
H 78 1 C 6	744	73	14	87	169	
H 78 1 C 8	741	73	8	81	178	
H 78 1 E 2	633	113	22	135	232	
H 78 1 E 4	686	98	16	114	200	
H 78 1 H 1	772	71	8	79	149	
H 78 1 H 5	697	80	7	87	216	
H 78 1 H 8	855	74	8	82	63	
$\bar{x}$	720,5	85,6	11,4	97	182,5	
s	58,49	14,21	4,54	17,99	46,25	

Tabelle 2:

Versuchsserie A

Mitose - Index [‰]

Kontrolle	VCR
33	107
32	85
32	113
6	87
	81
	135
	114
	79
	87
	82
$\bar{x}$ = 25,75	$\bar{x}$ = 97
s = 11,40	s = 17,99

Tab. 3 Versuchsserie B

Gruppe	Dauer der Trächtigkeit (Tage)	Termin der Tötung (Tage p.n.)	Dosis (mg/kg)	T_1-PSG	T_1-deg.	T_1-M.	T_1-M. deg.	T_2-PSG	T_2-deg.	T_2-M.	T_2-M. deg.	Stz.-M.	Stz.-M. deg.
H78/1A 9	23	5	0,5	++	++	+	+++	++	++	-	-	+++	+
H78/1A 9	23	5	0,5	+	+++	-	++++	++	++	-	-	++	++
H78/1A 9	23	5	0,5	+	+++	-	++++	++	++	-	-	-	++++
H78/1/ 1	22	5	0	+++	-	-	-	+	-	-	-	++++	-
H78/1/ 1	22	5	0	+++	+	-	-	-	-	-	-	++++	-
H78/1/ 1	22	5	0	+++	+	-	-	v	v	-	-	+++	+
H78/1/ 4	22	5	0,5	++++	-	-	-	-	-	-	-	+	+++
H78/1/ 4	22	5	0,5	+++	+	-	v	-	-	-	-	+	+++
H78/1/ 4	22	5	0,5	+++	+	-	-	-	-	-	-	+	+++
H78/1A14	22	6	0	-	v	-	-	+++	+	+++	+	+++	+
H78/1A16	22	6	0	-	v	-	-	+++	+	+++	+	+++	+
H78/1A26	22	6	0	-	-	-	-	+++	+	-	-	++	++
H78/1A20	22	6	0,5	-	++++	-	-	++	++	++	++	++	++
H78/1A22	22	6	0,5	-	-	-	v	++	++	+	+++	++	++
H78/1A32	22	6	0,5	-	v	-	-	++	++	+	+++	+	+++
H78/1B 2	22	6	0	-	-	-	-	+++	+	v	-	+++	+
H78/1B 2	22	6	0	-	-	-	v	+++	+	+++	v	+++	+
H78/1A28	22	6	0,25	v	-	-	-	+++	+	++	++	+++	+
H78/1B 8	22	6	0,25	v	v	-	v	+++	+	++	++	++	++
H78/1B10	22	6	0,25	+++	+	+	+++	v	-	-	-	+	+++
H78/1B 4	22	6	0,25	++	++	-	++++	v	-	-	-	+	+++

Legende: v = vereinzelt + = ca. 25% ++ = ca. 50% +++ = ca. 75% ++++ = 100% - = 0%

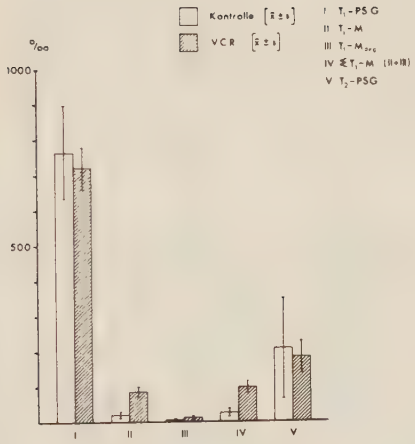

Kontrolle $(\bar{x} \pm s)$
VCR $(\bar{x} \pm s)$
I T_1 - PSG
II T_1 - M
III $T_1 - M_{neu}$
IV ΣT_1 - M (II+III)
V T_2 - PSG
‰
1000
500
I
II
III
IV
V

Fig. 1

Abbildungen

Histologisches Bild von Rattentestes 6 Tage p.n.
nach Applikation von 0,5 mg/kg KG VCR 4 Tage 20h p.n..

Legenden Abbildungen 1 - 3

Abb. 1 (Objektiv 10x)

T_1-Mitose: großer, dicker Pfeil

T_2-Mitose: große Pfeile

Stz.-Mitosen (intakt): kleine Pfeile

Stz.-Mitosen (degeneriert): kleine, gebogene Pfeile

Abb. 2 (Ausschnitt aus Abb. 1, Objektiv 63x)

T_2-Mitosen: große Pfeile

Stz.-Mitosen (intakt): kleine Pfeile

Stz.-Mitose (degeneriert): kleiner, gebogener Pfeil

Abb. 3 (Ojektiv 63x)

GZ.-Mitose (degeneriert): großer, gebogener Pfeil

Stz.-Mitosen (degeneriert): kleine, gebogene Pfeile

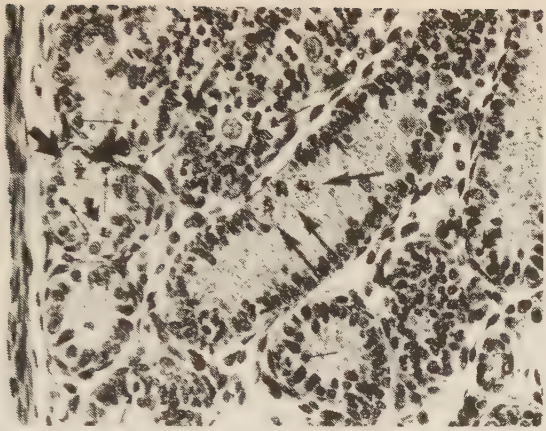


Abb. 1

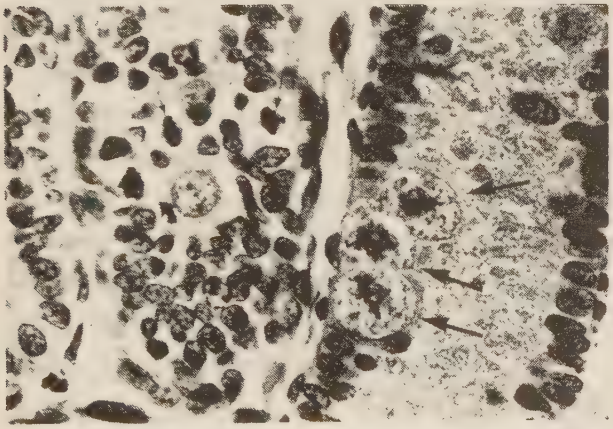


Abb. 2

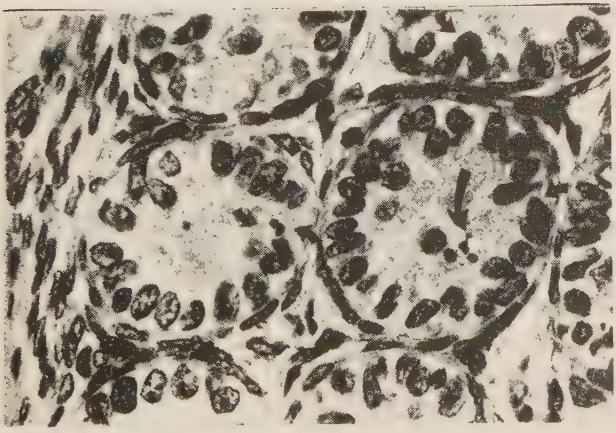


Abb. 3

Literatur

Allhoff, E., J. Heinrichs, E. Nitsiota und A. Seeberg - Elverfeldt: Histologische und autoradiographische Untersuchungen zur Kinetik der männlichen Geschlechtszellen zu Beginn der " Frühen Spermatogenese ". Untersuchungen an Wistarratten. Dissertation, Universität Düsseldorf 1975.

Courot, M., M.T. Hochereau and R. Ortavant: Spermatogenesis. In: The testis ed. by A.D. Johnson, W.R. Gomes and N.L. van Denmark, vol. 1, 339-434. New York: Academic Press 1970.

Dym, M. and D.W. Fawcett: Further observations on the number of spermatogonia, spermatocytes and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. Biology of Reproduction 4, 195-215 (1971).

v. Ebner, V.: Untersuchungen über den Bau von Samenkanälchen und die Entwicklung von Spermatozoiden bei den Säugethieren und den Meschen. Rollets Untersuchungen aus dem Institut für Phys. und Histol. in Graz s 200 Separat. Leipzig 1871.

v. Ebner, V.: Zur Spermatogenese bei den Säugethieren. Arch. mikrosk. Anat. Entw. mech. 31, 236-292 (1888).

Frei, E. III, J. Whang, R.B. Scoggins, E.J. van Scott, D.P. Rall and M. Ben: The stathmokinetik effect of vincristine. Cancer Res. 24, 1918-1925 (1964).

Hartenstein, R., H. Ehrhart und K. Hoffmann: Zellkinetische Untersuchungen beim Ehrlich - Ascites - Tumor unter Vincristin. Z. Krebsforsch. 79, 213-220 (1973).

Hilscher, W. und W. Maurer: Autoradiographische Bestimmung der Dauer der DNS-Verdoppelung und ihres zeitlichen Verlaufs bei Spermatogonien der Ratte durch Doppelmarkierung mit C-14 - und H-3 - Thymidin. Naturwissenschaften 49, 352 (1962).

Hilscher, W. and B. Hilscher: Kinetics of the Male Gametogenesis, andrologia 8 (2): 105-116 (1976).

Jellinghaus, w., R. Maidhof, B. Schultze und W. Maurer: Experimentelle Untersuchungen und zellkinetische Berechnungen zur Frage der Synchronisation mit Vincristin in vivo (Mäuseläukämie L 1210, Krypten-Epithelien der Maus), Z. Krebsforsch. 84, 116-176 (1975).

Klein, H.O., K.J. Lennartz, R. Gross, M. Eder und R. Fischer: In-vivo und In-vitro-Untersuchungen zur Zellkinetik und Synchronisation menschlicher Tumorzellen. Dtsch. med. Wschr. 97, 1273-1282 (1972).

Klein, H.O. und K.J. Lennartz: Chemotherapy after synchronization of tumor cells. Sem. Hemat. 11, 213-227 (1974).

Leblond, C.P. and Y. Clermont: Spermiogenesis of rat , mouse, hamster and guinea-pig as revealed by the " Periodic acid-Fuchsin Sulfurous acid " technique. Amer. Journ. Anat. 90, 167-216 (1952).

Leblond, C.P. and Y. Clermont: Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the rat. Ann. N.Y. Acad. Sci. 55, 548-573 (1952).

Leidl, W. und B. Waschke: Comparative aspects of the kinetics of the spermiogenesis.
In: Fortschritte der Andrologie, Vol. 1: Morphological aspects of andrology, 21-24 (1970).

Maurer - Schultze, B.: Verschiedene Anwendungsmöglichkeiten der Doppelmarkierungsmethode mit H-3- und C-14-Thymidin in zellkinetischen Untersuchungen.
Festvortrag zum 75. Geburtstag von Prof. Dr. W. Maurer am 27. 3. 1981 in Würzburg.

Monesi, V.: Study of DNA synthesis and the mitotic cycle in spermatogonia of the mouse, using tritium-labeled thymidine (Abstract.). Amer. Zool. 1, 374 (1961).

Monesi, V.: Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis, using tritiated thymidine.
Journ. Cell Biol. 14, 1-18 (1962).

Oakberg, E.F.: Sensivity and time of degeneration of spermatogenic cells irradiated in various stages of the maturation in the mouse.
Radiol. Res. 2, 369-391 (1955).

Oakberg, E.F.: Degeneration of spermatogonia of the mouse following exposure to X-rays and stages in the mitotic cycle at which cell death occurs.
Journ. Morph. 97, 39-54 (1955).

Oakberg, E.F.: A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the

seminiferous epithelium and germ cell renewal.
Amer. Journ. Anat. 99, 391-414 (1956).

Oakberg, E.F.: Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminferous epithelium. Amer. Journ. Anat. 99, 507-516 (1956).

Regaud, C.: Etudes sur la structure des tubes séminifères et sur la spermatogénèse chez les mammifères.
Arch. Anat. Micr. 4, 101-156 (1901).

Regaud, C. et J. Blanc: Actions des rayons x sur les diverses générations de la lignée spermatique. Extrême sensiblité des spermatogonies à ces rayons.
Compt. rend. Soc. biol. 58, 163-265 (1906).

Roosen - Runge, E.C.: Quantitative studies in spermaogenesis in the albino rat II. The duration of spermatogenesis and some effects of colchicine.
Amer. Journ. Anat. 88, 163-176 (1951).

Roosen - Runge, E.C. and L.O. Giesel: Quantitative studies in spermatogenesis in the albino rat.
Amer. Journ. Anat. 87, 1-30 (1950).

Tannock, J.F.: A comparision of the relative efficiences of various metaphase arrest agents.
Exp. cell Res. 47, 345-356 (1965).

Für die freundliche Überlassung eines Arbeitsplatzes danke ich Herrn Prof. Dr. med. H.-W. Schlipköter.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. W. Hilscher für die Überlassung des Themas und die große Unterstützung sowie die wertvollen Anregungen und Ratschläge während der Durchführung. In diesen Dank miteinbeziehen möchte ich seine Gattin, Frau B. Hilscher, die ebenfalls häufig mit Rat und Tat zur Seite stand.

Auch möchte ich mich sehr bedanken bei den Mitarbeitern von Herrn Prof. Dr. med. Hilscher, allen voran Frau Rehbein, die mich alle stets hilfsbereit besonders bei der technischen Durchführung der Arbeit sehr unterstützten.

Lebenslauf

Zur Person:	Joachim Maurer geb. am 14.05.1953 in Bonn evangelisch, deutscher Staatsbürger 1 jüngere Schwester
Eltern:	Vater: Prof. Dr. med. Rolf Maurer geb. am 29.04.1919 Chefarzt der HNO-Abteilung am "Ev. Krankenhaus" Bonn-Bad Godesberg Mutter: Dr. med. Elisabeth Maurer geb. Schüttler, geb. am 08.04.1923 Ärztin
Schulausbildung:	1959-63 Volksschule "Haydnschule" Bonn 1963-64 Volksschule "Godesheim" Bonn 1964-71 "Heinrich-Hertz-Gymnasium" Bonn 1971 Abitur
Wehrdienst:	1972-73 Grundwehrdienst
Studium:	WS 1971/72 Studium der Chemie/Physik an der Universität Bonn WS 1973/74 Studium der Chemie/sonst. Fach - SS 1975 an der Universität Münster WS 1975/76 Gaststudent in der Medizin an der "Katholischen Universität Löwen, Abteilung Kortrijk" in Belgien SS 1976 nach 3 ministeriell anerkannten Fachsemestern Zulassung zum 4. vorklinischen Semester Humanmedizin an der Universität Mainz SS 1976 Physikum SS 1977 Erste Ärztliche Prüfung WS 1977/78 Wechsel an die Universität Düsseldorf SS 1979 Zweite Ärztliche Prüfung SS 1980 Dritte Ärztliche Prüfung
Beruf:	Nov. 1980 Approbation zum Arzt und seit Jan. 1981 als Assistenzarzt der Inneren Abtlg. am "Lukaskrankenhaus Neuß"

FOTODRUCK J. MAINZ – Telefon: (02 41) 2 73 05
Neupforte 13, Nähe Markt, 5100 Aachen